

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 21, 1983, pp. 301–311

Vergleich dreier Ringversuche zur radioimmunologischen Thyrotropin-Bestimmung nach dem „Münchener Modell“¹⁾, ²⁾

Von I. Marschner,

Medizinische Klinik Innenstadt (Direktor Prof. Dr. med. E. Buchborn) der Universität München

W. G. Wood,

Klinik für Innere Medizin (Direktor Prof. Dr. med. P. C. Scriba) der Medizinischen Hochschule Lübeck

Dagmar van Thiel, J. Habermann, A. König,

Medizinische Klinik Innenstadt (Direktor Prof. Dr. med. E. Buchborn) der Universität München und

P. C. Scriba,

Klinik für Innere Medizin (Direktor Prof. Dr. med. P. C. Scriba) der Medizinischen Hochschule Lübeck

(Eingegangen am 31. August/24. November 1982)

Zusammenfassung: Es wird über die Ergebnisse eines Thyrotropin-Ringversuchs nach dem „Münchener Modell“ aus dem Jahre 1980 berichtet, und die Daten werden mit denen zweier früherer Ringversuche aus den Jahren 1977 und 1974 verglichen. Obwohl 1974 nur 4 verschiedene Thyrotropin-Kits verwendet wurden und aufgrund der geringeren Verbreitung Thyrotropin wesentlich „zentralisierter“ als in den folgenden Jahren bestimmt wurde (31 Teilnehmer), hat die Präzision im Inter-Labor-Vergleich gegenüber 1977 (12 Kits, 71 Teilnehmer) und nochmals gegenüber 1980 (15 Kits, 104 Teilnehmer) erheblich zugenommen. So lag der Variationskoeffizient der Ergebnisse aller Labors (Inter-Labor-VK) für eine Thyrotropin-Konzentration von 5 mE/l 1974 bei 75%, 1977 bei 45% und 1980 bei 20% (vergleichsweise für 15 mE/l: 1974 65%, 1977 22%, 1980 12%). Im gleichen Zeitraum hat die Benutzung von Kits gegenüber laboreigenen Methoden von 65 auf 95% zugenommen.

Es ist ein deutlicher Trend in Richtung Kurzinkubation zu verzeichnen. Bei den Kurzzeitassays besteht immer noch das Problem, daß niedrige Werte zu hoch gemessen werden. Generell sind jedoch die Artefakte durch hohe Leerwerte geringer geworden. Bei 2/3 aller Kits besteht noch eine vermeidbare Kreuzreaktion mit Choriongonadotropin.

Gegenüber 1974 (30%) benützten 1980 78% einen Computer zur Berechnung der Standardkurven und unbekannten Proben. Das am häufigsten verwendete Programm (46% der Computerbenutzer) war die Spline-Approximation.

¹⁾ Mit Unterstützung des Bundesministeriums für Forschung und Technologie und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 51).

²⁾ Die Ergebnisse wurden teilweise auf dem „International Symposium on Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine“ (Wien, Österreich, 21.–25. 6. 1982) vorgetragen.

Die trotz zunehmender methodischer Vielfalt und Verbreitung steigende Präzision der Thyrotropin-Bestimmung ist nur durch die ständige methodische Verbesserung in Richtung auf robuste Assays zu erklären, wozu in erster Linie auch die Einführung von Thyrotropin-freiem Humanserum als Standardmatrix (1974 16%, 1980 83% aller Teilnehmer) beigetragen hat. Die verschiedenen Möglichkeiten der externen Qualitätskontrolle von Hormonbestimmungen werden diskutiert.

Comparison of three external quality surveys of the radioimmunological determination of thyrotropin, using the Munich Model

Summary: The results of a thyrotropin external quality assessment survey (EQAS) carried out in 1980 using the "Munich Model" and including a "matched reagent" experiment are presented and are compared with the results from similar surveys carried out in 1974 and 1977.

Despite the fact that in 1974 only 4 different kits were used, compared with 12 in 1977 and 17 in 1980, the inter-laboratory precision has continually improved. This was reflected by the inter-laboratory coefficient of variation (CV) for all laboratories, which, for a sample with ca. 15 mU/l thyrotropin were: 65% (1974), 22% (1977) and 12% (1980), and for a sample containing ca. 5 mU/l thyrotropin: 75% (1974), 45% (1977) and 20% (1980). During the same period, the fraction of participants using commercial kits increased from 0.65 to 0.95.

There was a definite trend towards shorter assays, even though with such assays there is a danger that the measured values for low thyrotropin concentrations will be too high. In spite of the fact that the "high-blank" effects have to a large extent disappeared, many kits showed an unacceptably high cross-reactivity with human chorionic gonadotropin. A fraction of 0.30 of all participants in 1974 used computer-assisted data-processing, compared with 0.78 in 1980. In 1980, the most commonly used algorithm was a spline function (0.46 of participants using a computer for data-processing). Although the number of kits has increased, the precision has improved, showing that more robust methods are now employed. This has partly come about because of the introduction of human thyrotropin-free serum as matrix for the standards (1974 = 0.16, 1980 = 0.83 of all participants). Further external quality assessment programmes are discussed for the continual monitoring of hormone assay performance.

Einführung

Ziel der von unseren Laboratorien seit 1972 durchgeführten Ringversuche zu radioimmunologischen Hormonbestimmungen war es, nicht nur den jeweiligen Istzustand der Vergleichbarkeit von Labor zu Labor darzustellen, sondern in erster Linie durch Aufzeigen systematischer Fehler auf methodische Verbesserungen hinzuwirken (1–6). Um genügend Material für die statistische Auswertung zu erhalten, wurde folgender allgemeiner Aufbau für die Ringversuche gewählt: Zusammen mit einem Fragebogen über methodische Assaydetails wurden 20 tiefgefrorene oder lyophilisierte Serumproben verschickt. Ein Teil dieser Proben stellte Standards in hormonfreiem Serum dar, der Rest bestand aus Kontroll-Pool-Seren unterschiedlichen Hormongehalts, gegebenenfalls mit potentiell kreuzreagierenden Substanzen angereichert. Als Ergebnisse wurden neben den gefundenen Hormonkonzentrationen (Dreifachwerte) auch die Zählraten der Ringversuchsproben und der laboreigenen Standardkurve sowie die Standardkonzentrationen von letzterer verlangt. Diese Angaben ermöglichten uns u. a., beide Stan-

dardkurven – die laboreigene und die unter den Ringversuchen versteckte – mittels EDV zu berechnen, die übrigen Kontrollproben an beiden Kurven auszuwerten und die Regression zwischen beiden Kurven zu berechnen. Zusammen mit den methodischen Angaben lassen sich Unterschiede zwischen einzelnen Kits hinsichtlich Stabilität (VK der Ergebnisse von Benutzern des gleichen Kits), kreuzreagierender Substanzen oder auch die Auswirkung einer stark verkürzten Inkubationszeit auf die Ergebnisse aufzeigen. In der vorliegenden Arbeit wird über die Ergebnisse des 3. Thyrotropin-Ringversuchs aus dem Jahre 1980 berichtet, und diese Daten werden denjenigen zweier früher, nämlich 1974 (2) und 1977 (6) durchgeführter Ringversuche gegenübergestellt.

Material und Methoden

Herstellung der Ringversuchsproben

Seren von Blutspendern wurden entsprechend ihrem Thyrotropin-Gehalt nach verschiedenen Konzentrationsbereichen gepoolt. Für die höheren Konzentrationen wurde das Blut 30 min nach

Thyroliberin-Applikation abgenommen. Zwei der Kontrollseren stammten allein von einer jeweiligen einzelnen Blutspende, um zu untersuchen, ob das Poolen vieler Seren demgegenüber unbekannte Artefakte einbringt, die sich z.B. in einem höheren Inter-Labor-VK gegenüber den Einzelseren ausdrückt. Sämtliche verwendete Seren waren HB_s-Antigen und -Antikörper-negativ. Aus dem Serumpool mit dem niedrigsten Thyrotropin-Gehalt (1 mE/l) wurde das restliche Thyrotropin mittels Affinitätschromatographie entfernt. Hierzu wurde aus Thyrotropin-Antiserum mittels Chromatographie auf DEAE-Cellulose die IgG-Fraktion isoliert und an Bromcyan-aktivierte Cellulose gekoppelt. Die Cellulose wurde anschließend ausreichend gewaschen. Pro 50 ml Serum wurde 1 g Antikörper-gekoppelte Cellulose zugegeben, das Gemisch bei 4 °C im Batchverfahren über 12 Stunden gerührt, das Serum danach über eine Fritte abgesaugt und anschließend ultrafiltriert. Die unspezifische Tracerbindung des Serums war vor und nach der Extraktion gleich, der Thyrotropin-Gehalt unter der Nachweisgrenze unseres Routine-Assays (<0,5 mE/l Thyrotropin).

Sämtliche Pool-Seren wurden mit 5 bar Stickstoff durch einen Asbestfilter (Seitz, Merkur BFP 14/2 Porzellan-Einschichtenfilter, Seitz-Werke, Bad Kreuznach) gepreßt, um Bakterien und Fibrinreste zu entfernen. Erst nach diesem Reinigungsschritt wurden Aliquots des Thyrotropin-freien Serums mit Thyrotropin-Standard (WHO-IRP 68/38, NIBSC, London, England) auf die Konzentrationen 1, 2, 5, 10, 20 und 50 mE/l Thyrotropin gebracht. Insgesamt wurden 15.000 Aliquots à 1 ml in 5 ml-Fläschchen abgefüllt, in einer industriellen Großanlage lyophilisiert und unter Stickstoff-Begasung verschlossen. Die Zusammenstellung der Ringversuchsproben 1980 zeigt Tabelle 1. Zu den Ringversuchen 1974 und 1977 wurden die Proben tiefgefroren in Trockeneis versandt.

Tab. 1. Zusammensetzung der Proben für den Thyrotropin-Ringversuch 1980.

Proben-Nr.	Bezeichnung	Poolbereich mE/l Thyrotropin
1	Pool C	3 – 5
2	Pool A + 10 kE/l HCG*)	0,7 – 2
3	Pool B	2 – 3
4	Pool H	>20
5	Pool D	5 – 7
6	Standard 0 mE/l	
7	Pool B	
8	Standard 20 mE/l	
9	Standard 5 mE/l	
10	Pool G	12 – 20
11	Standard 10 mE/l	
12	Standard 50 mE/l	
13	Pool E	7 – 9
14	Pool A	
15	Spenderserum I	
16	Spenderserum II	
17	Standard 1 mE/l	
18	Pool F	9 – 12
19	Pool B	
20	Standard 2 mE/l	

*) Choriogonadotropin

Reagenzien für das „Matched Reagents“ Programm

Zehn Laboratorien, die entweder wissenschaftlich über die Thyrotropin-Bestimmung gearbeitet hatten oder sich mit Qualitätskontrolle von Hormonbestimmungen befassen, erklärten sich auf Anfrage bereit, neben der Teilnahme am allgemeinen Ringversuch die Proben auch noch mit einem in unserem Labor hergestellten „Kit“ zu messen.

Der Kit bestand aus:

- Thyrotropin-Antiserum R2/74 (aus eigener Immunisierung), Verdünnung 1:3.250, 2 × 5 ml, 100 kE/l Choriogonadotropin zur Absättigung der mit Choriogonadotropin und Lutropin kreuzreagierenden Antikörperpopulation, lyophilisiert.
- präzipitierender Antikörper (2. Antikörper) von der Ziege (Fa. Pösel, Frankfurt) Verdünnung 1:30, 12 ml, lyophilisiert.
- [¹²⁵I]Thyrotropin (Markierung nach *Greenwood & Hunter*) entsprechend 30.000 Imp./min · 100 µl, 2 × 50 ml mit 70 mg/l Kaninchengammaglobulin (Fa. Serva, Heidelberg), lyophilisiert.
- Polyethylenglycol (PEG 6000) 12 g + 1,8 g NaCl, zu lösen in 200 ml dest. Wasser.

Tabelle 2 zeigt das Pipettierschema, nach dem die 20 Proben mit dem Matched-Reagents-Kit zu messen waren. Vier Teilnehmer führten den Ansatz ein zweites Mal mit tiefgefroren versandtem Tracer durch. Damit wollten wir der Frage nachgehen, ob durch die Lyophilisation und den normalen Versandweg der Tracer an Immunreaktivität einbüßt.

Tab. 2. Testdurchführung. Pipettier- und Inkubationsschema.

Reagenzien	Proben Nr. 1–20 (dreifach)	unspezifische Bindung (dreifach)
Serum-Proben	100 µl	200 µl
Erster Antikörper	100 µl	–
40–42 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren		
[¹²⁵ I]Thyrotropin	100 µl	100 µl
7 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren		
Zweiter Antikörper	100 µl	100 µl
Polyethylenglykol	400 µl	400 µl
15 min bei Raumtemperatur stehenlassen		
10 min bei 3000 g zentrifugieren und den Überstand absaugen		
Auffüllen mit je 1 ml Polyethylenglykol		
sofort nochmals 10 min bei 3000 g zentrifugieren, den Überstand absaugen, das Präzipitat 1 min im Gamma-Zähler messen		

Mit dem Matched-Reagents-Versuch sollte die Frage beantwortet werden, welche Präzision von Labor zu Labor unter Verwendung eines robusten Kits und synchroner Durchführung heute erreicht werden kann.

Datenerfassung

Die vom Teilnehmer zurückgesandten numerischen Ergebnisse ebenso wie die Angaben zur Methodik wurden auf Lochkarten zur Datenverarbeitung erfaßt. Hierzu wurde ein modulares Programmsystem – bestehend aus 30 Programmen bzw. Subroutinen – erstellt, das eine einheitliche Auswertung dieser komplexen Ringversuche erlaubte. Die Angaben pro Teilnehmer füllten insgesamt 30 Lochkarten. Es sei jedoch an dieser Stelle nicht verschwiegen, daß aufgrund unserer Erfahrungen die vom Teilnehmer erbetenen Angaben von Ringversuch zu Ringversuch weniger wurden, da wir erkannten, daß sich nur einige wenige Angaben zur Methodik statistisch relevant auswerten ließen und ein Großteil der Angaben früherer Ringversuche zu nicht interpretierbaren statistischen Ergebnissen führte. Zur Weiterverarbeitung wurden die Angaben auf Magnetplatte eingelesen. Bei der Verschlüsselung und weiteren Verarbeitung der Ergebnisse wurde auf strikte Anonymität geachtet. So war die Identität der Teilnehmer jeweils nur dem Veranstalter bekannt.

EDV-Auswertung

Als Hardware stand uns eine Siemens 404/3 EDV-Anlage mit Magnetplatte und -band, Plotter, Lochkartenperipherie und Schnelldrucker zur Verfügung. Für die Gesamtstatistik wurden zwar die Mittelwerte aller Teilnehmer oder einer Untergruppe berechnet, auf die Ergebnisblätter ausgedruckt wurde jedoch der sogenannte „truncated mean“ (Eliminierung der unteren und oberen 5% Ausreißer unter Annahme einer Normalverteilung).

Sowohl die jeweilige laboreigene Standardkurve (Kurve 1) als auch die versteckte Standardkurve (Kurve 2) wurde einheitlich mit Splinefunktionen berechnet (7, 8). Für jede der 13 „Nicht-Standards“ fielen also drei Ergebnisse an, nämlich einmal die vom

Teilnehmer gemessene, die nach Kurve 1 und die nach Kurve 2 berechnete Konzentration. Der Unterschied zwischen der eigenen Angabe und dem nach Kurve 1 berechneten Wert entstand durch die Differenz zwischen dem vom Teilnehmer verwendeten Kurvenberechnungsverfahren und unserem Splineprogramm. Der Unterschied im Verlauf von Kurve 1 und Kurve 2 bzw. der Unterschied der nach Kurve 1 und Kurve 2 berechneten Werte entstand vorwiegend durch Differenzen der Standards und der Standardmatrix (Thyrotropin-freies Humanserum bzw. Proteinpuffer oder tierische Seren). Jeder Teilnehmer erhielt nach Auswertung einen Schnelldruckerausdruck seiner individuellen Ergebnisse und eine Druckergraphik der Kurven 1 und 2 (Abb. 1). Die Ergebnisse der übrigen Teilnehmer wurden in Form des jeweiligen Mittelwertes

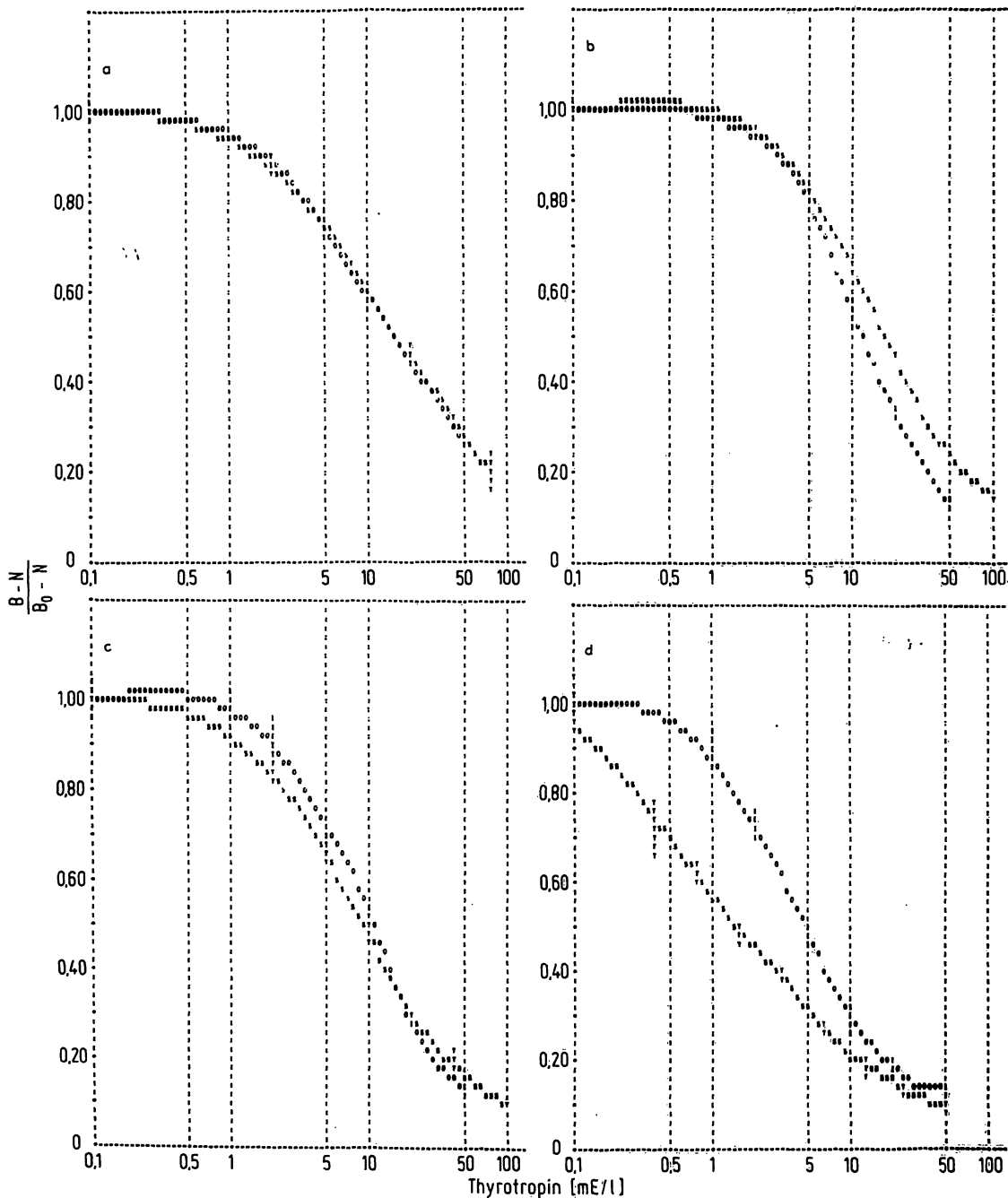


Abb. 1. Vier Beispiele für den Verlauf von laboreigener Standardkurve (Kurve I, SSS) und versteckter Wiederfindekurve (Kurve II, 000) (Schnelldruckergraphik).

a) Idealfall: völlige Übereinstimmung beider Kurven, b) bis d): nicht-paralleler Verlauf. Unbekannte Proben werden im Vergleich zu einer Standardkurve (Thyrotropin-Standard MRC 68/38) in Thyrotropin-freiem Humanserum (b) zu hoch, (c) im unteren Bereich zu niedrig und im oberen zu hoch und (d) generell zu niedrig gemessen. Standardabweichungen (s_x , SEM) Kurve I = T; Kurve II = I.

(truncated mean) und der Standardabweichung den eigenen Ergebnissen gegenübergestellt. Den Teilnehmern, die häufiger verwendete Kits benutzten ($n \geq 7$) wurden auch diese entsprechenden „Kit-internen“ Mittelwerte und Standardabweichungen ausgedruckt.

Korrelation r , Regression b und Achsenabschnitt a der Regressionsgeraden $y = a + b \cdot x$ wurden für die eigenen Angaben gegen die Kurve 1-Werte, eigene Angaben gegen Kurve 2-Werte und Kurve 1- gegen Kurve 2-Werte ausgedruckt. Aus den drei identischen Poolseren wurde der VK in der Serie berechnet.

Ergebnisse

Im Jahre 1980 hatten insgesamt 104 Laboratorien ihre Teilnahme zugesagt und Proben erhalten. Da einige Laboratorien mit mehreren Methoden teilnahmen, erhielten wir 109 Antwortblätter, von denen 101 vollständig auswertbar waren.

Tabelle 3 listet die verwendeten Kits und die Häufigkeit ihrer Anwendung auf.

Die wichtigsten Ergebnisse sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die von uns angegebenen Sollwerte der versteckten Standardkurve wurden von den zehn „Referenzlaboratorien“ mit deren eigenen Assays im Mittel mit erstaunlicher Genauigkeit wiedergefunden. Der Umstand berechtigt dazu, die Meßergebnisse der Referenzlaboratorien für die Poolseren als Referenzwerte anzusehen. Die statistische Manipulation des „truncated mean“ ändert wenig an den Mittelwerten aller Laboratorien, senkt jedoch verständlicherweise erheblich den Interlabor-VK.

Greift man den am meisten verwendeten Kit heraus, so liegt der Inter-Labor-VK bei dieser Gruppe erwartungsgemäß deutlich unter dem VK aller Teil-

Tab. 3. Übersicht über die im Thyrotropin-Ringversuch 1980 verwendeten Methoden.

Methoden-Nr.	Hersteller	Kit-Bezeichnung	Anzahl der Teilnehmer	davon modifiziert
1	Henning, Berlin	TSH-RIA	41	11
2	Biosigma GmbH, München	^{125}I HS-TSA-RIA	10	2
3	Byk-Mallinckrodt, Dietzenbach	RIA-mat TSH	9	1
4	Amersham-Buchler, Braunschweig	TSH Kit	8	
5	Behring, Marburg	RIA-gnost hTSH	7	
6	Corning, Lahn-Giessen	Immophase TSH	7	
7	Becton-Dickinson, Heidelberg	TSH RIA	4	
8	Abbott, Ingelheim	TSH Kit	3	
9	Serono, Freiburg	TSH-PLUS	2	
10	Serono, Freiburg	TSH-INSTA	2	
11	Pharmacia, Freiburg	Phadebas-TSH Test	2	
12	BIO-RAD, München	Quantimmune HTSH	2	2
13	CIS-IDW, Dreieich	TSH-Kit	2	
14	IRE, Frechen	TSH Kit	2	
15	Beckman, München	RIA Kit HTSH	1	
16	Laboreigene Methode		7	

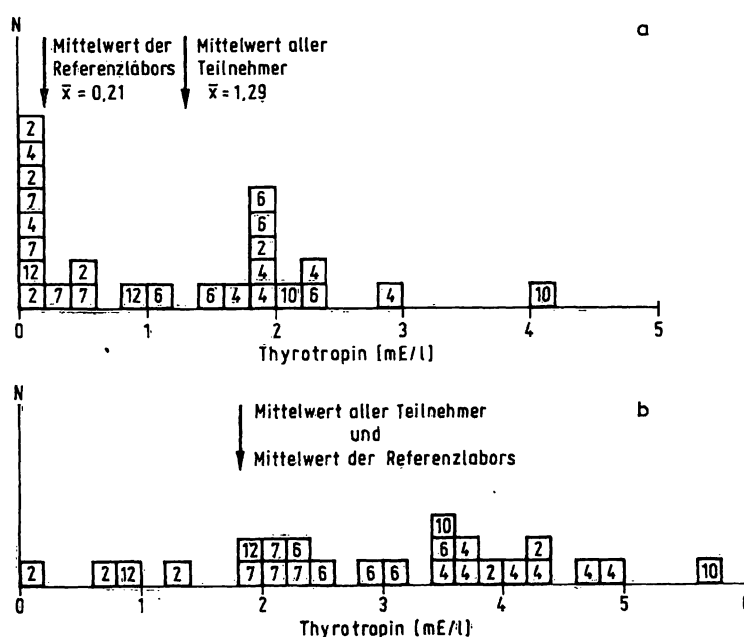


Abb. 2. Kurzzeitassays (Gesamtinkubationszeit 5 h). Am Beispiel (a) der Proben Nr. 6 („Thyrotropin-freies“ Serum) und (b) Nr. 14 ist zu sehen, daß Proben im unteren Thyrotropin-Konzentrationsbereich im Mittel zu hoch gemessen werden.

Tab. 4. Ergebnisse des Thyrotropin-Ringversuchs 1980.

Poolseren													
Proben-Nr.	Referenzlabors				alle Teilnehmer		Truncated means		Kit Nr. 1		Kurzassays		
	Matched Reagents		eigene Assays		N = 101				N = 41		N = 25		
	N = 10		N = 10										
	\bar{x}	VK	\bar{x}	VK	\bar{x}	VK	\bar{x}	VK	\bar{x}	VK	\bar{x}	VK	
14	1,3	19	1,8	64	1,9	68	1,7	59	0,9	35	2,9	49	
2	1,3	25	1,6	49	2,7	99	2,0	70	0,9	36	5,2	72	
3, 7, 19	2,7	12	2,7	46	2,8	54	2,6	46	1,6	33	3,9	41	
1	4,3	12	4,2	24	4,2	32	4,0	27	3,2	20	5,2	33	
5	6,0	9	6,6	23	5,9	25	5,7	20	4,9	16	6,8	26	
13	8,0	8	7,9	19	7,7	23	7,6	17	6,8	14	8,1	24	
15	9,4	5	9,4	18	9,4	26	9,3	16	8,7	10	9,6	15	
18	10,1	5	9,7	17	9,8	19	9,7	15	9,0	16	10,0	17	
10	17,5	7	16,6	15	17,4	16	17,0	12	16,0	13	17,1	12	
16	20,7	6	19,7	20	19,4	16	19,2	13	18,5	11	19,6	20	
4	29,5	12	28,4	22	31,6	18	31,3	14	28,9	11	33,3	23	
Standards													
	Sollwert		\bar{x}	VK	\bar{x}	VK	\bar{x}	VK	\bar{x}	VK	\bar{x}	VK	
6	0		0,2	117	1,3	94	1,0	76	0,7	104	1,2	92	
17	1		1,2	57	1,6	63	1,4	53	1,2	51	2,0	57	
20	2		2,0	33	2,3	47	2,2	41	1,7	36	2,8	39	
9	5		5,0	14	5,1	25	5,0	21	4,5	19	5,3	16	
11	10		10,1	20	10,9	18	10,6	15	9,5	10	11,6	16	
8	20		21,4	26	21,4	16	20,9	12	19,5	9	21,5	15	
12	50		44,5	27	48,2	25	47,3	19	43,4	12	54,5	30	

nehmer, auch nach Eliminierung der oberen und unteren 5% Extremwerte. Er liegt jedoch im Mittel immer noch doppelt so hoch wie der der Referenzlabors im Matched-Reagents-Versuch.

Unverkennbar ist die Tendenz bei den Kurzzeitasays, niedrige Werte zu hoch zu messen (Abb. 2 und Tab. 4).

In Probe Nr. 6, von uns als Thyrotropin-frei bezeichnet, wurde mit den eigenen Assays der Referenzlaboratorien im Mittel 0,2 mE/l Thyrotropin gemessen, was unter der statistischen Nachweisgrenze aller verwendeten Assays liegt, und deshalb nicht von Null unterschieden werden kann.

Bezogen auf den jeweiligen eigenen Standard-Nullwert als 100% B/B₀ war die mittlere B/B₀-Rate aller Labors von Probe Nr. 6 93,5%, s = 9,3), die Extremwerte 116,5 und 47,7%.

1974 lag der Mittelwert aller Labors für Thyrotropin-freies Serum bei 3,3 mE/l, 1978 bei 2,2 und 1980 bei 1,3 mE/l. Das bedeutet, daß sich die Nachweisempfindlichkeit generell durch teilweise Bewältigung des Problems hoher Leerwerte im Beobachtungszeitraum deutlich verbessert hat.

Die mittlere Steigung b zwischen den Kurven 1 und 2 aller Teilnehmer war 1,022 (s = 0,19). Der Intra-

Assay-VK (berechnet aus den Dreifachwerten der drei identischen Proben 3, 7 und 19) aller Teilnehmer lag im Konzentrationsbereich um 3 mE/l Thyrotropin bei 10,9% (Extremwerte 0,3–74,3%), der Inter-Labor-VK in diesem Bereich zum Vergleich bei 57%.

Unerwartet war die hohe Kreuzreaktion vieler Kits mit Choriongonadotropin, zu erkennen an den Dif-

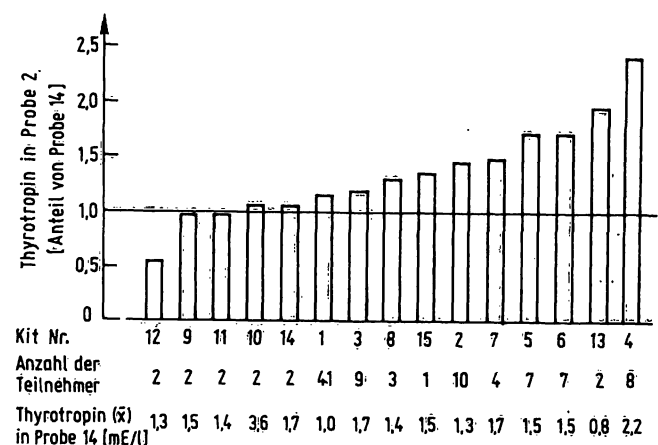


Abb. 3. Kreuzreaktion mit Choriongonadotropin. Der Mittelwert der jeweils korrespondierenden Probe 14 (Pool A ohne Choriongonadotropin-Zusatz) ist gleich 1,0 gesetzt und der Wert für Probe 2 (Pool A mit 10 kE/l Choriongonadotropin im Serum) als Anteil des von Probe 14 entsprechend aufgetragen. Kit-Nummern siehe Tab. 3.

ferenzen der Meßwerte für Probe 14 (Pool A ohne HCG) und Probe 2 (Pool A mit Choriongonadotropin). Abbildung 3 zeigt das Ausmaß der Kreuzreaktion in %, bezogen auf den Meßwert für Probe 14 als 100%. Auch wenn man den hohen Intra-Assay-VK in diesem Meßbereich berücksichtigt, so darf der Schluß gezogen werden, daß das Gros der Kit-Hersteller – wohl aus Kostengründen – die mit Lutropin kreuzreagierenden Anteile der Thyrotropin-Antiseren zu wenig mit Choriongonadotropin absättigt.

Benutzten 1974 11 von 31 Teilnehmern (35,5%) einen selbst aufgebauten Assay, so waren es 1977 nur noch 8 von 71 (11,3%) und 1980 5 von 99 (5,1%). 1974 wurden 4, 1977 12 und 1980 15 verschiedene Kits von den Teilnehmern verwendet. Von 30 Teilnehmern (einer ohne Angabe) zeichneten 1974 21 (70%) die Standardkurve von Hand und werteten daran die unbekannten Proben aus. 1980 waren es nur noch 23 von 106 (21,7%), die übrigen benützten Tischrechner bis Großrechenanlagen (Tab. 5). 14 Laboratorien von den 83 Computerbenutzern (18%) verließen sich dabei ausschließlich auf die Berechnung und fertigten keine Kurvengraphik an.

1974 lösten nur 5 Teilnehmer ihre Standards in Thyrotropin-freiem Serum, sämtlich Benutzer eigener Methoden. Von den vier damals in Deutschland gebräuchlichen Thyrotropin-Kits verwendete keiner Thyrotropin-freies Serum als Standardmatrix, sondern statt dessen Puffer, Rinderalbumin, Humanalbumin oder verdünntes Humanserum. 1980 ver-

Tab. 5. Für die Berechnung der Standardkurven von den Teilnehmern verwendete Rechenverfahren.

	1974 N = 9	1977 N = 60 (%)	1980 N = 83 (%)
Spline-Approximation	5	25 (41,7)	38 (45,8)
Logit	2	6 (10)	17 (20,5)
Lineare Interpolation	1	1 (1,7)	10 (12,0)
Polynome 3. Ordnung	1	20 (33,3)	6 (7,2)
Keine Angaben		8 (13,3)	12 (14,5)

wendeten 84 von 101 Teilnehmern (83,2%) Thyrotropin-freies Humanserum als Standardmatrix entweder in eigenen Assays oder in Form entsprechend hergestellter Kits. 6 Kits, benutzt von insgesamt 17 Teilnehmern, enthielten als Standardlösungsmittel Pferdeserum, Rinderalbumin-Puffer, Rinderalbumin-Gelatine-Puffer.

Im Vergleich zur durchschnittlichen Assaydauer von 1974 war 1980 ein deutlicher Trend zum Kurzzeitasay zu spüren. 1974 arbeiteten 70% der Teilnehmer mit Inkubationszeiten unter 30 Stunden. Im Mittel mit 22 Stunden, die übrigen inkubierten zwischen 50–160 Stunden. Ein Fünftel der Teilnehmer arbeitete bei 4°C, alle anderen bei Raumtemperatur. 1980 inkubierten 90% der Teilnehmer weniger als 30 Stunden, im Mittel 16 Stunden, rund ein Viertel davon zwischen 21/2 und 5 Stunden. Waren auch die Kurzzeitassays mit einem mittleren Intra-Assay-

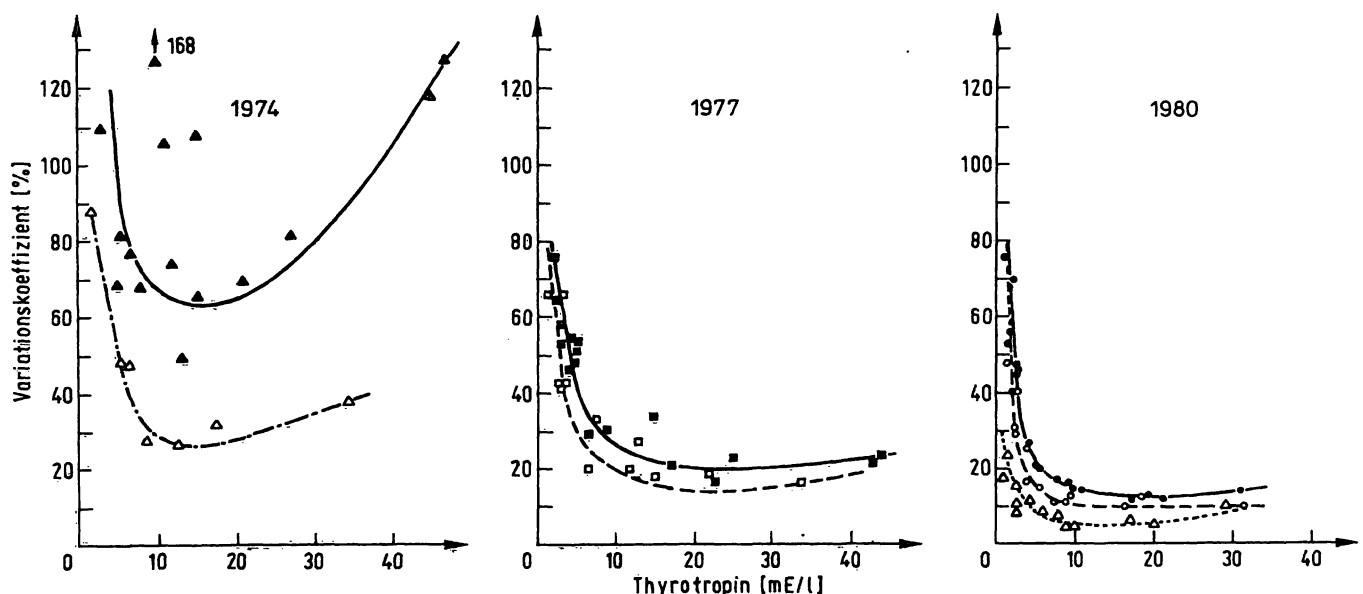


Abb. 4. Vergleich der Präzisionsprofile (Inter-Labor-VK aller Teilnehmer gegen die entsprechende Thyrotropin-Konzentration der Probe) der 3 Thyrotropin-Ringversuche.

1977 war der Inter-Labor-VK der eigenen Angaben aller Teilnehmer bereits niedriger als 1974 beim Ablesen der Proben an den Wiederfindekurven (---). Dasselbe gilt entsprechend für den Vergleich zwischen 1977 und 1980. Der Inter-Labor-VK im Matched-Reagents-Ringversuch der Referenzlaboratorien markiert demgegenüber ein Fernziel weiterer Präzisionsverbesserung (Δ - - - Δ).

VK von 7,8% (alle Labors 10,9%) in ihrer Präzision nicht schlechter als die Assays mit längerer Inkubationszeit, so war doch die Tendenz, niedrige Thyrotropin-Konzentrationen zu hoch zu messen, unübersehbar (siehe Tab. 4). 1980 arbeitete nur ein Teilnehmer bei 4 °C, 72 bei Raumtemperatur, 15 bei Temperaturen zwischen 25 und 37 °C und 13 wechselten die Assaytemperaturen bis zu drei Mal zwischen 4 und 37 °C. Die drei Assays mit den extremsten Inkubationsbedingungen (21/2 Stunden bei Raumtemperatur, 144 Stunden bei 4 °C und 60 Stunden bei 37 °C) brachten die schlechtesten Ergebnisse.

Bei aller Heterogenität der Inkubationsbedingungen (Zeit, Temperatur, unterschiedlicher Antikörper, Unterschiede in der Standardmatrix und Trennverfahren) hat jedoch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Labor zu Labor in den sechs Jahren von 1974 bis 1980 in überraschender und ermutigender Weise zugenommen. Das wird bei Auftragen der Ergebnisse in Form von Präzisionsprofilen (% VK gegen Hormonkonzentration) besonders deutlich (Abb. 4). War 1974 durch Ablesen der Ergebnisse von der versteckten Standardkurve gegenüber den eigenen Angaben noch eine drastische Verbesserung der Vergleichbarkeit zu erzielen, so machte dieser Effekt in den folgenden Ringversuchen nur noch wenig aus. Der Inter-Labor-VK der „eigenen Angaben“ lag 1980 für Konzentrationen über 6 mE/l zwischen 12 und 20%, jedoch unter 6 mE/l zwischen 20 und 76%. Im Matched-Reagents-Versuch lag der VK für letzteren Konzentrationsbereich zwischen 8 und 24%. Keinerlei Einfluß auf die Ergebnisse im Matched-Reagents-Versuch hatte die Verwendung von lyophilisiertem gegenüber tiefgefrorenem Tracer.

Diskussion

Allgemeines

Im Vergleich zu den Standardverfahren der Klinischen Chemie, wo die Kalibrierung in der Regel keine Probleme bereitet, bieten die komplexen Reaktionsvorgänge bei radioimmunologischen Bestimmungen zahlreiche zusätzliche Fehlermöglichkeiten. So sind, so weit verfügbar, internationale Standardpräparationen zwar eine der wesentlichen Voraussetzungen der Kalibrierung und Qualitätskontrolle, die Benutzung solcher Standards garantiert jedoch keinesfalls Richtigkeit der Ergebnisse. Von wesentlichem Einfluß ist z.B. das radioaktiv markierte Antigen, das durch Reinheit des Ausgangsmaterials, Art der Markierung, Haltbarkeit bei der Lagerung und nicht zuletzt auch durch die Menge, in der es einge-

setzt wird, die Qualität der Ergebnisse entscheidend beeinflusst. Die zur Messung verwendeten Antiseren – die entscheidenden Reagenzien beim Radioimmunoassay – sind kaum zu standardisieren. Auch hier hängt die Qualität (Titer, Assoziationskonstante, Kreuzreaktion) vom verwendeten Ausgangsmaterial ab, die Frage jedoch, ob, wieviel und wie brauchbaren Antikörper die Tiere produzieren, ist im wesentlichen nicht beeinflussbar. Prinzipiell wird es bis auf weiteres (die Ergebnisse mit monoklonalen Antikörpern sind noch abzuwarten) nie von einem Antikörper solche Quantitäten geben, daß alle interessierten Laboratorien ein und denselben Antikörper verwenden könnten. Hier besteht ein ganz wesentlicher Unterschied zu den Reinheits- und Standardisierungskriterien der übrigen klinisch-chemischen Methoden. Erschwerend kommt hinzu, daß Antikörper verschiedener Herkunft gegen unterschiedliche immundeterminante Gruppen ein und desselben Antigens gerichtet sein können. Das macht insbesondere dann, wenn verschiedene Formen ein und desselben zu messenden Hormons im Serum zirkulieren (z.B. beim Parathormon), diese Bruchstücke noch in unterschiedlichen Konzentrationen vorkommen, die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Labor zu Labor von vornherein unmöglich. Gegen die Einflüsse von Standard, Tracer und Antikörper sind die Einflüsse des Trennverfahrens, der mathematischen Auswertung, quantitativ untergeordnet, wenn auch nicht zu vernachlässigen.

Lange Zeit unterschätzt wurde der Einfluß des Pipettierschemas selbst. Hier konnten wir zeigen, daß allein durch Variation der Pipettiervorschrift unbrauchbare Radioimmunoassays unter Verwendung der gleichen Reagenzien in stabile, präzise und reproduzierbare Meßverfahren verwandelt werden konnten (9). Diese Erkenntnis ist vom Standpunkt der Qualitätskontrolle insofern von großer Bedeutung, als die Arbeitsvorschrift selbst am ehesten verändert, d.h. optimiert werden kann, wohingegen man die Unzulänglichkeiten des Radioimmunoassays hinsichtlich Heterogenität der verwendeten Reagenzien vorerst in Kauf nehmen muß. Unser Hauptaugenmerk bei der Auswertung von Ringversuchsergebnissen lag demnach auch auf der Methodik.

Möglichkeiten der externen Qualitätskontrolle von Radioimmunoassays

Die Tatsache, daß die externe Qualitätskontrolle von Radioimmunoassays schwierig, zugleich jedoch unerlässlich ist, hat die Entwicklung verschiedener Verfahren gefördert. Vorausgeschickt werden darf, daß es kein „ideales“ Verfahren gibt, das etwa leicht

durchzuführen ist, effektiv und billig zugleich wäre. Die einzelnen Möglichkeiten sind daher auch weniger als Konkurrenzmodelle, sondern vielmehr als ergänzende Ansätze zur externen Qualitätskontrolle zu verstehen:

a) „Münchener Modell“, d.h. Ringversuche nach dem hier beschriebenen Versuchsaufbau.

b) „Doppelproben“. Analog den Verfahren in der Klinischen Chemie hat man Ringversuche auch in der radioimmunologischen Analytik veranstaltet. Hierbei werden vorzugsweise zwei Kontrollseren mit unterschiedlichem Antigengehalt bzw. unterschiedlichem Gehalt an Störsubstanzen an die Teilnehmer versandt (10). Probleme tauchen bei der Interpretation der Ergebnisse auf. Da absolut messende Verfahren als Vergleichsmaßstab fehlen (ausgenommen für einige Steroidhormone), ist es schwierig zu sagen, wer richtig und wer falsch mißt. In Ermangelung besserer Verfahren hat man sich deshalb entweder des Mittelwerts und der Standardabweichung aller Teilnehmer oder der entsprechenden Daten speziell ausgewählter Referenzlaboratorien als Maßstab bedient, wobei bisweilen durch statistische Verfahren die extrem niedrigen und extrem hohen Werte eliminiert werden. Im ersten Fall kann dies, wie z.B. früher bei der Bestimmung des Thyroxins geschehen, dazu führen, daß einige wenige Laboratorien, die über exakt messende Verfahren verfügen, deshalb bei der Qualitätskontrolle „durchfallen“, weil die Masse der Teilnehmer fälschlicherweise zu hoch mißt. Der Vorteil dieses Verfahrens der Qualitätskontrolle liegt in seiner einfachen Praktikabilität hinsichtlich der Probenbeschaffung, Versand, Datenerfassung und Auswertung sowie dem erschwinglichen Preis. Deshalb wird es auch stets die Basis der externen Qualitätskontrolle von Hormonbestimmungen bleiben.

Einige Ringversuchsveranstalter haben das Verfahren dahingehend modifiziert, daß sie aus einem größeren Pool von Kontrollseren jeweils mehrfach ein oder zwei Proben verschicken und so, da jede Probe von jedem Teilnehmer auf diese Weise mehrfach bestimmt wird, eine Schätzung des Interassay-Variationskoeffizienten geben können. Dieses Verfahren, das große Vorteile bietet, ist aus organisatorischen Gründen wieder nur in kleinerem Maßstab praktikabel, da der Aufwand für den Veranstalter durch die Beschaffung und Lagerung der benötigten Serum-mengen enorm ansteigt.

c) *Matched Reagents*

Vorzugsweise von der Weltgesundheitsorganisation (Human Reproductive Unit) eingesetzt wird ein

Verfahren, bei dem neben einer Reihe von Kontrollseren auch Reagenzien verschickt werden (11). Die Teilnehmer sollen die Kontrollproben einmal mit ihrer hauseigenen Methode, zum anderen mit den beigefügten Reagenzien nach der gemeinsamen Arbeitsvorschrift messen. Der externen Qualitätskontrolle ist hier also ein Kalibrierungsschritt beigeordnet. Die benötigten Reagenzienmengen verbieten die allgemeine Durchführung dieses Prinzips. So können pro Staat nur ein bis zwei Laboratorien an diesem Ringversuchsmodell teilnehmen. Es hat sich in der Praxis jedoch gezeigt, daß diese Laboratorien dann jeweils eine Art Kontrollinstanz für die übrigen Laboratorien eines Landes darstellen und somit eine beliebige Breitenwirkung erzielt werden kann.

d) *Kontrollinstanz für Kits*

Eine weitere denkbare Möglichkeit der externen Qualitätskontrolle wäre, insbesondere angesichts der zunehmenden Benutzung von kommerziell hergestellten Kits, die Schaffung einer Instanz zur Prüfung der Kits. Diese Instanz dürfte sich nicht darauf beschränken, ein Produkt einer Firma einmalig zu prüfen, sondern müßte wegen der Instabilität der Reagenzien jede Charge erneut prüfen. Wenn dieses Verfahren auch sicher nicht uneffektiv wäre, so hätte es doch zwei ganz entscheidende Nachteile:

1. Angesichts des anwachsenden Angebots an kommerziellen Kits wären die laufenden Personal- und Sachkosten einer solchen Institution sehr hoch.
2. Es würden lediglich fehlerhafte Reagenzien bzw. Fehler in der Assaymethodik entdeckt, nicht erfaßt würden die Fehler, die dem Anwender unterlaufen.

Nun sind zwar, wie unsere Erfahrungen bis in die jüngste Zeit zeigen (2, 5, 6), auch viele auf dem Markt gut eingeführte Kits ungeeignet, weil fehlerhaft, und es wäre einfach, diese Art von Fehlern durch eine Kontrollinstanz zu eliminieren, eine zusätzliche externe Qualitätskontrolle wäre jedoch unerlässlich, da auch mit einwandfreien Reagenzien und vernünftiger Arbeitsvorschrift durch unsachgemäße Handhabung fehlerhafte Ergebnisse erzielt werden können.

Diskussion der Ergebnisse

Die Ringversuche vom Typ „Münchener Modell“ sind durch die Verknüpfung von 20 Meßergebnissen mit Methodenfragebogen besonders geeignet, individuelle oder Kit-abhängige methodische Fehler zu erkennen, Trends aufzuzeigen, den Einfluß von

Störsubstanzen zu ermitteln und Präzisionsprofile der Inter-Labor-Vergleichbarkeit zu erstellen.

Eine methodische Schwierigkeit lag bisher immer in der Herstellung ausreichender Mengen von hormonfreiem Serum als Matrix für die Standards. Bei den Ringversuchen 1974 und 1977 setzten wir Poolseren von freiwilligen Probanden ein, die unter Thyrotropin-suppressiver Behandlung mit synthetischen Schilddrüsenhormonen standen. Leider waren nicht immer alle dieser Seren brauchbar, so daß wir diese Methode verlassen haben. Die hier beschriebene Methode der Affinitätschromatographie im Batch-Verfahren unter Einsatz von Poolseren mit niedriger Thyrotropin-Ausgangskonzentration führte zur Gewinnung von mehreren Litern nahezu Thyrotropin-freien Serums (Restgehalt $\sim 0,2$ mE/l). Wie die Ergebnisse des Ringversuchs 1980 zeigen, ist das so gewonnene „Nullserum“ durchaus brauchbar. Natürlich kann diese Methode modifiziert auch für andere Antigene angewendet werden. Da das Antikörper-Sepharose-Konjugat regenerierbar ist, können beliebige Mengen Serum hormonfrei gemacht werden.

Positive Erfahrungen haben wir mit der Aufbereitung der Poolseren durch Asbestfiltration gemacht. Offensichtlich werden durch das Mischen verschiedener Seren keine unspezifischen Störfaktoren eingebracht, da der Inter-Labor-VK für die Monoseren 15 und 16 in der gleichen Größenordnung liegt, wie für die Seren 10 und 18 mit vergleichbarer Thyrotropin-Konzentration. Die Lyophilisation der Proben stellte gegenüber dem Versand in Trockeneis eine entscheidende Vereinfachung und Verbesserung ohne Qualitätsverlust dar.

Die Spline-Approximation (7, 8) hat sich als Grundlage unseres modularen Programmpakets zur Kurvenberechnung und Auswertung der Ringversuchsergebnisse sehr bewährt. Seit 1973 wurden damit die Ergebnisse von insgesamt etwa 1500 Teilnehmern aus 12 Ringversuchen ohne Schwierigkeiten berechnet. Mit einem anderen Algorithmus, z.B. einer logit-Version, hätten wir alleine durch das Auswerteverfahren insbesondere im niedrigen Konzentrationsbereich, erhebliche Rechenartefakte eingebracht (12). Wie Tabelle 5 zeigt, hat sich fast die Hälfte der Teilnehmer, die ihre Proben mittels EDV auswertet, für dieses flexible Verfahren entschieden.

Beim Vergleich der Assaymethoden der drei Ringversuche fallen im wesentlichen zwei Umstände auf. Zum ersten ist der Trend zum Kit unübersehbar. 1974 hat noch ein Drittel der Teilnehmer selbstentwickelte Assays bevorzugt. Von den sieben selbst aufgebauten Thyrotropin-Methoden, mit denen 1980 Ringversuchsproben gemessen wurden,

stammten drei aus einem Labor, so daß nur fünf Teilnehmer keine Kits verwendet haben. Diese Teilnehmer waren schon 1974 unter den 11 Anwendern eigener Verfahren. Das bedeutet, daß einerseits Labors, die schon länger Thyrotropin-Bestimmungen durchführen, ihre eigenen Verfahren zugunsten von Kits aufgegeben haben und andererseits, daß alle „Newcomer“ von vornherein Kits verwenden. Schnitten 1974 die Teilnehmer mit eigenen Verfahren wesentlich besser ab als die Kitbenutzer, so galt dies für 1980 nicht mehr.

Der zweite auffallende Trend ist der zur Verkürzung der Inkubationszeit. Einige Labors versuchen, durch Erhöhung der Reaktionstemperatur eine raschere Gleichgewichtseinstellung zu erreichen. Das Arbeiten bei verschiedenen Temperaturen (z.B. Vorinkubation bei Raumtemperatur, Inkubation nach Zugabe von Tracer bei 37°C , nach Zugabe von zweitem Antikörper bei 4°C) ist umständlich und beinhaltet neue Störfaktoren. Sicher braucht man nicht 150 Stunden zu inkubieren, um empfindlich Thyrotropin zu messen, jedoch scheint bei der kritischen Sichtung der Ergebnisse das Optimum zwischen 36 und 48 Stunden zu liegen. Generell messen die Kurzzeitasays die niedrigen Konzentrationen falsch zu hoch (Tab. 4 und Abb. 2), wodurch z.B. die diagnostische Aussage von Basalkonzentrationen stark begrenzt wird.

Erstaunlich ist die erhebliche Kreuzreaktion mit Choriongonadotropin, die einige Kits aufweisen. Obwohl generell bekannt ist, daß nahezu alle Thyrotropin-Antikörper mit Lutropin kreuzreagieren, scheinen sich einige Firmen das teure Choriongonadotropin zur Absättigung der kreuzreagierenden Antikörperpopulationen zu sparen. Entsprechend ist der VK für Probe 2 auch wesentlich größer als der für Probe 14, obwohl beide den gleichen Thyrotropin-Gehalt haben (Tab. 4). Hier liegt sicher noch ein Ansatzpunkt für die methodische Verbesserung einiger Kits.

Die Notwendigkeit der Verwendung von Thyrotropin-freiem Humanserum als Standardmatrix scheint heute generell akzeptiert zu sein. Nur noch rund 17% der Teilnehmer verwenden – wissentlich oder unwissentlich – Kits, deren Hersteller statt dessen tierische Seren und Proteinpuffer einsetzen. Wir führen es in erster Linie auf diese allgemeine Verbesserung der Standardmatrices zurück, daß es trotz des methodischen Pluralismus seit 1974 zu einer ermutigenden Verbesserung des Inter-Labor-VKs kam. Entgegen zahlreichen Prognosen ist dieses Ziel nicht erreicht worden durch Zentralisierung, Vereinheitlichung der verwendeten Reagenzien bzw. der

Methodik oder ähnlich dirigistische Maßnahmen (13), wohl aber unter dem Einfluß der externen Qualitätskontrolle. Der Wettbewerb der Kitindustrie hat nicht unter Vernachlässigung methodischer Qualitätskriterien und bevorzugter Beachtung des kommerziellen Vorteils bzw. der Werbewirksamkeit zu der befürchteten Verschlechterung der Vergleichbarkeit der Ergebnisse geführt. Auch wenn es „Ausreißer“ gab, so hat die Firmenkonkurrenz ganz im Gegenteil eine mit den hier vorliegenden Ergebnissen objektiv dokumentierte generelle Qualitätsverbesserung gebracht. In diesem Punkt des Inter-Labor-VK besteht in der Bundesrepublik Deutschland eine Situation, die nicht schlechter ist als in Ländern mit zentralistisch organisiertem Gesundheitswesen (11). Das werten wir als eines der wesentlichsten Ergebnisse aus dem Vergleich dieser drei Ringversuche.

Der Aufbau und die Art der Auswertung der Ringversuche nach dem „Münchener Modell“ erlaubt es, anhand der aufgezeigten Kriterien die Qualität und Robustheit (14) der einzelnen Kits zu beurteilen sowie nach methodischen Fehlern, Instabilität, Kreuzreaktionen und zu geringer Empfindlichkeit zu fahnden. Die Resultate erleichtern dem Anwender die Entscheidungsfindung auf dem für den Einzelnen

unüberschaubaren Kit-Markt. Auf diesem Wege sollte es auch möglich sein, fundierte methodische Vorschläge zu erarbeiten, die als „Empfohlene Methoden“ ein Schritt auf dem Weg zu Referenzmethoden sein könnten. „Empfohlene Methoden“ wären nicht nur ein wünschenswerter Rahmen für Anwender und Kit-Industrie, sondern könnten dazu dienen, das Problem der Sollwertermittlung für Ringversuchsproben nach dem Modell der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie durch Referenzlaboratorien anzugehen. Weiter wäre denkbar, die Sollwertermittlung eines größeren Pools von Kontrollseren (entsprechend z.B. den in Tabelle 4 im oberen Abschnitt aufgeführten Proben) im Rahmen eines Ringversuchs nach dem Münchener Modell (einschließlich Matched-Reagents-Ringversuch mit „Empfohlenen Methoden“ durch Referenzlabors) vorzunehmen und dann über einen längeren Zeitraum aus diesem Pool Probenpaare zu verschicken.

So sind die Ringversuche nach dem Münchener Modell keinesfalls ein Konkurrenzunternehmen zu den herkömmlichen Ringversuchen, sondern eine wertvolle Ergänzung, die Informationen liefert, die sonst nicht zu erhalten sind. Ihre Durchführung in Abständen von zwei bis drei Jahren pro Antigen läßt den Aufwand vertretbar erscheinen.

Literatur

1. Marschner, I., Bottermann, P., Erhardt, F., Löffler, G., Linke, R., Maier, V., Schwandt, P., Vogt, W. & Scriba, P. (1974) *Horm. Metab. Res.* 6, 293–296.
2. Marschner, I., Erhardt, F. W. & Scriba, P. C. (1976) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 14, 345–351.
3. Horn, K., Marschner, I. & Scriba, P. C. (1976) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 14, 353–360.
4. Wood, W. G., Bauer, M., Marschner, I. & Scriba, P. C. (1980) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 18, 183–192.
5. Wood, W. G., Bauer, M., Horn, K., Marschner, I., van Thiel, Dagmar, Wachter, Christine & Scriba, P. C. (1980) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 18, 511–519.
6. Wood, W. G., Habermann, J., Marschner, I. & Scriba, P. C. (1980) In: *Radioimmunoassay of hormones, proteins and enzymes. Excerpta Medica Amsterdam 1980*, p. 39–47.
7. Reinsch, C. H. (1967) *Numer. Math.* 10, 177–183.
8. Marschner, I., Erhardt, F. & Scriba, P. C. (1974) In: *Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine, IAEA-Proceedings, Vienna, Vol. 1*, p. 111–122.
9. Erhardt, F., Marschner, I., Pickardt, Renate C. & Scriba, P. C. (1973) *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 11, 381–387.
10. Breuer, H., Jungbluth, D., Marschner, I., Röhle, G., Scriba, P. C. & Wood, W. G. (1978) In: *Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine, IAEA-Proceedings, Vienna 1978*, p. 81–90.
11. Malan, G. P. (1979) In: *Radioimmunoassay 1979* (Bizollon, Ch. A., ed.) Elsevier North Holland, p. 257–267.
12. Marschner, I., Herndl, R. & Scriba, P. C. (1980) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 18, 105–109.
13. Wood, W. G., Marschner, I. & Scriba, P. C. (1978) In: *Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine, IAEA-Proceedings, Vienna 1978*, p. 127–139.
14. Ekins, R. (1979) In: *Radioimmunoassay 1979* (Bizollon, Ch. A., ed.) Elsevier North Holland, p. 239–255.

Dr. med. Ingo Marschner
Dr. med. Dagmar van Thiel
Dr. med. Jürgen Habermann
Dr. med. August König
Medizinische Klinik Innenstadt
der Universität München
Ziemssenstraße 1
D-8000 München 2

Dr. William Graham Wood, PhD
Prof. Dr. med. Peter Christian Scriba
Klinik für Innere Medizin
der Medizinischen Hochschule Lübeck
Ratzeburger Allee 160
D-2400 Lübeck 1

